Caldasia17 (2): 231 - 236, 1993

MICROSPORIDIA PARASITOS DE LARVAS DE MOSQUITOS DE LA COSTA PACIFICA DEL CHOCO

JUAN S. ZULUAGA
Corporación para Investigaciones Biológicas, Apartado 7378, Medellín, Colombia.

JAROSLAV WEISER
Centro de Patología de Insectos, Academia de Ciencias de Checoslovaquia, Praga, Checoslovaquia.

WILLIAM ROJAS
Corporación para Investigaciones Biológicas, Apartado 7378, Medellín, Colombia.

SERGIO ORDUZ
Corporación para Investigaciones Biológicas, Apartado 7378, Medellín, Colombia.

Resumen
Se reportan dos géneros de microsporidia que parasitan larvas de mosquitos en criaderos naturales de tres localidades en la costa Pacífica Chocoana. *Vavraia* sp. (Microsporida: Pleistophoridae) parásita larvas de *Wyeomyia circumcincta*, de *Wyeomya simmsi y de Anopheles neivai*, recolectadas en las rosetas de especies de la familia Bromeliaceae en las localidades de Arusí y Joví. *Amblyospora* sp. (Microsporida: Amblyosporidae) parásita larvas de *Aedes angustivittatus* de criaderos terrestres semipermanentes en la localidad de Nuquí. Se describe la morfología de estos dos microsporidia al microscopio óptico. Estudios preliminares de infección en larvas de Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus y *Anopheles albimanus*, criadas en laboratorio, indican que *Vavraia* sp. infecta las tres especies, con preferencia a *Culex quinquefasciatus*. Las larvas expuestas a esporas de *Amblyospora* sp. no presentaron infección. Se discute el posible papel de estos dos géneros en el control de las poblaciones de mosquitos.

Abstract
Two genera of Microsporidia were found infecting mosquito larvae in three localities on the Pacific coast of Choco. *Vavraia* sp. (Microsporida: Pleistophoridae) was found in larvae of *Wyeomyia circumcincta, W. simmsi* and *Anopheles albimanus* collected from plants of the Bromeliacea family in Arusí y Joví. *Amblyospora* sp. (Microsporida: Amblyosporidae) was found parasitizing *Aedes angustivittatus* larvae collected from a terrestrial breeding pond in the locality of Nuquí. Morphology of the spores of the two parasites under light microscopy is described, as well as preliminary data on host range when exposed to laboratory reared *Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus* and *Anopheles albimanus*. Their role in mosquito control is discussed.

Introducción

Los microsporidia son parásitos intracelulares con un amplio rango de hospederos en el reino animal. Varias especies han sido descritas como parásitos de larvas y adultos de mosquitos, a los que infectan por vía oral o por un mecanismo transovárico. Estos microsporidia desempeñan un papel importante en el control natural de las poblaciones de mosquitos (Weiser & Prasertphon, 1981). Este hecho ha sido bien documentado en los estudios de Hazard & Oldacre (1975), Vavra & Undeen (1981), Weiser & Prasertphon (1981), Lord & Hall (1983), Becnel *et al.*, (1987 y 1989). Recientemente Brooks (1988) publicó una revisión completa de los microsporidia entomopatógenos.

Los géneros *Nosema, Amblyospora* y *Vavraia* son los más importantes patógenos de insectos. Su estudio ha recibido un considerable interés debido a su condición de potenciales agentes de control biológico de mosquitos (Andreadis, 1989; Anthony *et al.*, 1978; Diarra & Togebaye, 1990 y Kelly *et al.*, 1981) y por su habilidad para disminuir la capacidad vectorial y longevidad de *Anopheles stephensi* en infecciones simultáneas con *Plasmodium falciparum* y *P. yoelii* (Margos *et al.*, 1992 y Schenker *et al.*, 1992).

Las especies de los géneros *Amblyospora y Thelohania* son transmitidas transováricamente de larvas infectadas que han sobrevivido hasta el estado adulto (Weiser & Prasertphon, 1981; Andreadis, 1990). Las larvas de mosquito se infectan por vía oral, mientras que su permanencia y dispersión depende de la densidad poblacional del huésped. Las tasas de infección varían desde el mínimo hasta epizootias, que en ocasiones pueden llegar a diezmar las poblaciones de mosquitos (Weiser & Prasertphon, 1981).

En Colombia se ha reportado la infección de larvas de simúlidos por microsporidia (*Polydispyrenia simulii y Polydispyrenia* sp.) en los municipios de La Calera y Chisacá, Cundinamarca (Torres, 1988; Hernández, 1990; Torres *et al.*, 1991).

En este artículo se presentan dos especies de microsporidia que han sido identificados como *A. kadunae* o *A. benigna* y *Vavraia culicis*. Se presentan observaciones morfológicas al microscopio óptico de las dos especies y se reportan los resultados preliminares de las pruebas de infectividad bajo condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Las larvas de mosquitos fueron recolectadas en abril de 1991 en las localidades de Arusí, Joví y Nuquí, en el departamento del Chocó dentro de un programa de evaluación de estrategias de control de malaria en la costa Pacífica Chocoana. En las localidades de Arusí y Joví las larvas se recolectaron en las rosetas de especies de Bromeliaceae que crecían sobre árboles de totumo (*Crescentia cujete*). Las muestras de agua se tomaron en una bandeja de peltre, utilizando un sifón y las larvas infectadas se seleccionaron por observación macroscópica. En Nuquí las larvas fueron recolectadas en criaderos terrestres semipermanentes y las larvas infectadas se seleccionaron con la metodología anterior. A las larvas infectadas se les removieron las masas de microsporidium para hacer preparaciones en fresco y coloración de Giemsa (Poinar & Thomas, 1984). Se aumentó el tiempo de exposición de la coloración a 20 minutos y la concentración del colorante se duplicó. Las placas coloreadas con Giemsa y las preparaciones en fresco se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión para establecer los diferentes estados de desarrollo de *Vavraia culicis y Amblyospora* sp. Las esporas se sometieron a las técnicas de presión entre lámina y laminilla y deshidratación e hidratación para observar la extrusión del microfilamento polar (Weiser, 1982).

Las esporas de las dos especies y el microfilamento polar en *Vavraia culicis* se midieron en preparaciones en fresco. Además, se expusieron larvas sanas de *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus y Aedes aegypti* criadas en el laboratorio con esporas de los microsporidia para determinar la especificidad del parásito.

Resultados y discusión

El microsporidium *Vavraia culicis* infecta larvas de *Wyeomyia circumcincta, Wy. simmsi y Anopheles neivai*, recolectadas en los depósitos de agua de las plantas de la famila Bromeliaceae. De las larvas evaluadas se encontraron infectadas 11 de las dos especies del género *Wyeomyia* y solamente dos de *Anopheles neivai*. Este microsporidium infecta principalmente el tejido graso de las larvas y las lesiones producidas som masas blanquecinas localizadas fundamentalmente entre el tercer y octavo segmento abdominal (fig. 1). El porcentaje de infección de los abdómenes fue de 20% en *Anopheles neivai* y de 29.1% en las dos especies de *Wyeomyia*.

Los pansporoblastos de *Vavraia culicis* tienen 8, 16, 32 y 64 esporas cada uno (figs. 2a a 2d). En fresco las esporas son cilíndricas y miden 4.57 ± 0.36 µm de largo (n=25) y 2.47 ± 0.12 µm de ancho (n=25) (fig. 3a). Estos datos son similares a los reportados por Weiser y Coluzzi (1972) para *Vavraia culicis* al infectar larvas de *Culiseta longiareolata*. En las

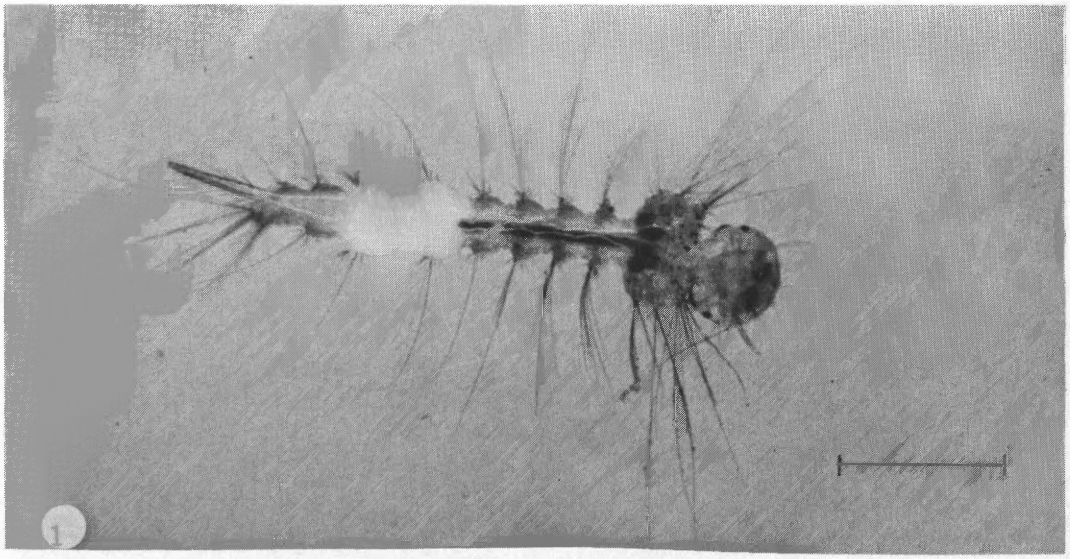


Figura 1. Larva de *Wyeomiya circumcincta*, infectada con microsporidium en los segmentos abdominales 5 y 6, montaje en fresco microscopio estereoscopio, 1.6x.

coloraciones con Giemsa se observaron solamente esporas uninucleadas. Así mismo, se observó el microfilamento polar cuando las preparaciones de esporas se sometieron a presión entre lámina y laminilla. Su longitud promedio fue 35.6± 5.97 µm (n=6) y en algunos de ellos se observó el microfilamento con aproximadamente 13 vueltas (fig. 3b).

La infección de larvas de mosquitos con esporas uninucleadas de *Vavraia* sp. ocurre durante su alimentación. Una vez en el intestino medio y probablemente debido a cambios en la presión osmótica, las esporas expulsan el microfilamento polar e introducen el material nuclear a la célula huésped, en la que se multiplican y posteriormente la infección alcanza el tejido graso (fig.4). La acumulación de las esporas dentro de las células del tejido graso causa su hipertrofia y posterior separación, transformándose en un conjunto de masas más o menos desorganizadas. Al morir las larvas, las esporas uninucleadas son liberadas al ambiente, desde donde pueden infectar nuevas larvas para así reiniciar su ciclo en la siguiente generación de mosquitos (Wang, 1982; Weiser & Prasertphon, 1981).

Al exponer el primer estadio de *Anopheles albimanus, Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* a un inóculo de esporas de *Vavraia culicis*, la infección fue menor del 20% en *Ae. aegypti*, mientras que en *Anopheles albimanus* y *Culex quinquefasciatus* el porcentaje de infección varió entre el 30 y 50%.

El hallazgo de microsporida en el micro ambiente de las rosetas de bromelias no es excepcional (Frank & Curtis, 1977), generalmente se asocia con la presencia de larvas o pupas infectadas que no cumplen su desarrollo hasta adulto, o por adultos infectados que mueren en los criaderos después de depositar sus huevos. Las larvas que eclosionan en estos microambientes se alimentan de los cadáveres o remanentes de los cuerpos adquiriendo de esta manera la infección. Otro mecanismo de dispersión de los microsporidia en estos microambientes es la transmisión vía huevos como fue demostrada para *Vavraia culicis* (Wang, 1982).

El microsporidium de los criaderos terrestres corresponde morfológicamente al género *Amblyospora*, posiblemente *A. kadunae* o *A. benigna*. Las esporas son ovoides con el polaroplasto en el polo posterior (fig. 5a) y se

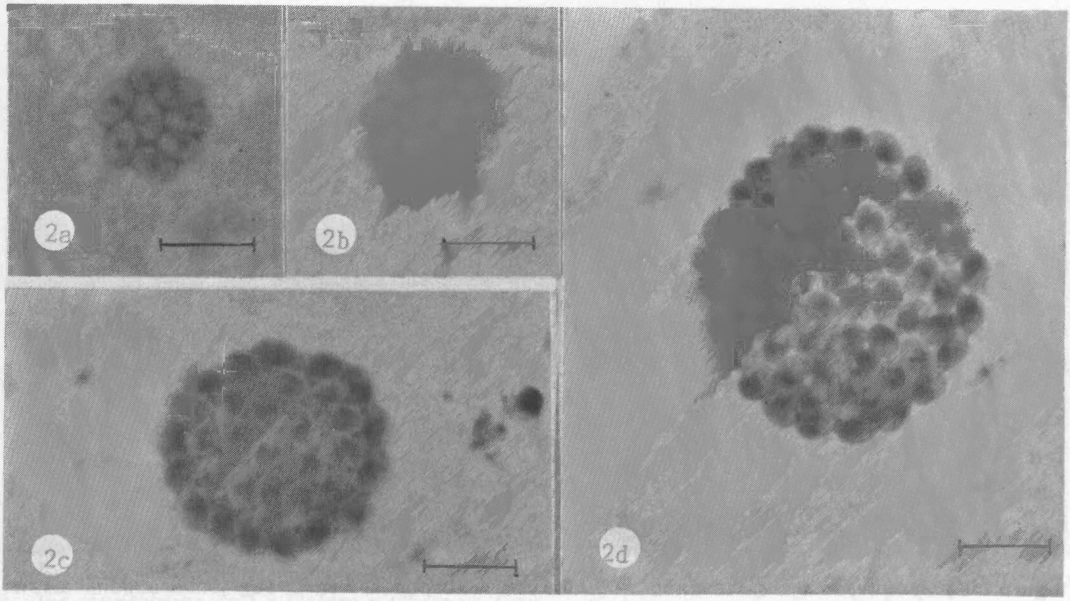
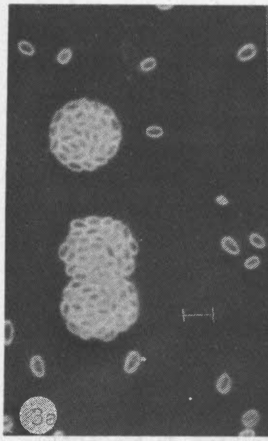


Figura 2. Pansporoblastos de *Vavraia culicis* con 8 (2a), 16 (2b), 32 (2c) y 64 (2d) esporas, coloración de Giemsa, 100x.



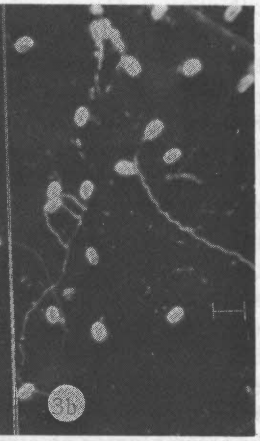


Figura 3a. Pansporoblastos y esporas de *Vavraia culicis* microscopía de contraste de fase, montaje en fresco, 40x.

Figura 3b. Montaje en fresco de esporas de *Vavraia culicis* en el cual se observa el microfilamento polar con aproximadamente 13 enrollamientos, microscopía de contraste de fase, 40x.

agrupan en vesículas esporofóricas de ocho esporas (fig. 5b). Fuera del huésped las vesículas se desintegran en menos de 5 minutos liberando las esporas.

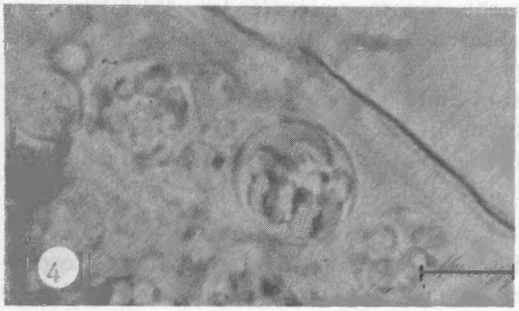
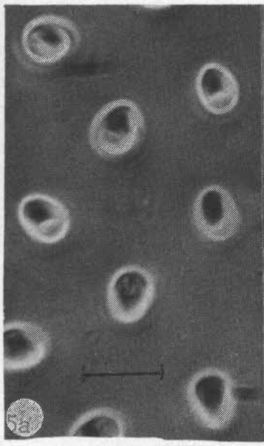


Figura 4. Sección de larva de *Wyeomyia circumcincta* en la cual se observa la epidermis y el tejido graso, infectado con pansporoblastos de *Vavraia culicis* en sus primeros estadíos de desarrollo, 100x.

Amblyospora sp. infecta larvas de *Aedes angustivittatus* desde el tórax hasta el último segmento abdominal. En fresco las esporas miden 5.59 ± 0.41 μm de largo por 3.76 ± 0.15 μm de ancho (n=35). Estas medidas están dentro del rango que se presenta en especies de este género (Hazard & Oldacre, 1975). No se logró observar el microfilamento polar cuando se utilizaron los métodos de deshidratación e hidratación y presión entre lámina y laminilla descritos por Weiser (1982).

Las pruebas experimentales de infección de larvas de mosquitos criadas en el laboratorio no fueron exitosas debido posiblemente a que las especies del género Amblyospora conocidas necesitan un copépodo como huésped intermediario (Sweeney & Becnel, 1991). En consecuencia el papel de *Amblyospora* sp., en el control de mosquitos podría ser limitado.



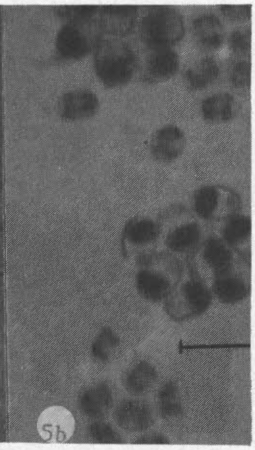


Figura 5a. Esporas de *Amblyospora* sp., en las cuales se observa el polaroplasto en la parte posterior, 100x.

Figura 5b. Pansporoblastos de *Amblyospora* sp. con 8 esporas en diferentes estadíos de desarrollo, 100x.

El potencial de *Vavraia* sp. como agente de control biológico es mayor, debido a su facilidad de dispersión y transmisión de la infección en condiciones naturales. Las dos especies reportadas podrían tener un mayor significado en el control biológico si se establece con certeza que puedan disminuir la capacidad vectorial de *Anopheles albimanus* como en el caso de *Anopheles stephensi* infectado por *Nosema algerae* (Margos *et al*., 1992, Schenker *et al*., 1992).

Torres (1988), Hernández (1990) Y Torres *et al*. (1991) en zonas paramunas de Cundinamarca han reportado microsporidia que parasitaban moscas negras (Diptera: Simuliidae). El hallazgo y descripción preliminar de estas dos especies de microsporidia, se constituye en el primer reporte de *Amblyospora* sp. y *Vavraia culicis* que parasitan larvas de mosquitos de la familia Culicidae en Colombia y el primer reporte de *Vavraia culicis* infectando larvas de *Wyeomia* sp.

Agradecimientos

Esta investigación recibió apoyo financiero del TDR de la Organización Mundial de la Salud y Colciencias. Los autores desean expresar su agradecimiento al Entomólogo Tadashi Kano, Unidad de Control Biológico, CIB, por la identificación de las especies de mosquitos.

Literatura citada

Andreadis, T.G. 1989. Infection of a field population of *Aedes cantor* with the polymorphyc microsporidian, Amblyospora connecticus via release of the intermediate copepod host. *J.Am. Mosq. Control Assoc.* 4: 81-85.

____.1990. Polimorphic microsporidia of mosquitoes: potential for biological control. In New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases, Alan R. Liss, Inc 177-188.

Anthony, D.W., Savage, K.E., Hazard, E.I., Avery, S.W., Boston, M.D. & S.W. Oldacre 1978. Field test with *Nosema algerae* Vavra and Undeen (Microsporidia: Nosematidae) againt *Anopheles albimanus* Wiedemann in Panama. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.* 1: 17-28.

Becnel, J., Hazard, E.I., Fukuda, T. & V. Sprague. 1987. Life cicle of *Culicospora magna* Kudo (1920) (Microsporida: Culicosporidae) in *Culex restuans* Theobals with special reference to sexuality. *J. Protozool.* 34: 313-322.

________________________, 1989. Development of *Edhazardia aedis* (Kudo, 1930) N.G.,N. Comb. (Microsporida: Amblyosporida) in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J. Protozool.* 36: 119-139.

Brooks, W.M. 1988. Entomogenous Protozoa. Handbook of Natural Pesticides. Volumen V. Microbial Insecticides Part A. Entomogenus Protozoa and Fungi. C.M. Ignoffo & N. Bhushan-Mandava (eds.), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Diarra, K. & B.S. Togebaye. 1990. Eude d'une infection microspridienne naturelle chez *Anopheles gambie* Giles (Diptera, Culicidae) moutique vecteur du paludisme au Sénégal. *Acta Protozool.* 29: 163-168.

Frank, J.H. & G.A. Curtis. 1977. On the bionomics of bromeliad-inhabiting mosquitoes. VII.

Incidence and effect of *Pilosporella fishi*, a parasite of *Wyeomyia vanduzeei*. *Mosquito News*, 37(3): 487-489.

Hazard, E.I., S.W. Oldacre, 1975. Revision of Microsporida (Protozoa) close to *Thelohania*, with descriptions of one family, eight new genera, and thirteen new species. *Agric. Res. Serv. U.S.D.A. Tech. Bull.* No 1530: iv 1-104.

Hernández, L. 1990. Estudios preliminares de Microsporidios patógenos en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) de la región de Chisacá-Cundinamarca. Trabajo de grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 42 pág.

Kelly, J.F., Anthony, D.W. & C.R. Dillard, 1981. A laboratory evaluation of the microsporidian Vavraia culicis as an agent for mosquito control. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 117-122.

Lord, J. & D.W.- Hall. 1983. A new microsporidian parasite of the mosquito *Aedes taenorhynchus*. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 301-304.

Margos, G., Maier, W.A., & H.M. Seitz. 1992. The effect of nosematosis on the development of *Plasmodium falciparum in Anopheles stephensi*. *Parasitol. Res.* 78: 168-171.

Poinar, G.O. & G.M. Thomas. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press. New York. 351.

Schenker, W., Maier, W.A., & H.M. Seitz. 1992. The effects of *Nosema algerae* on the development of *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi*. *Parasitol. Res.* 78: 56-59.

Sweeney, A.W. & J.J. Becnel. 1991. Potencial of Microsporidia for the Biological Control of Mosquitoes. *Parasitology Today.* 7(8): 217-220.

Torres, O. 1988. Estudios preliminares de microsporidios y otros patógenos en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) de La Calera. Tesis de grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 109 pág.

____ , **Muñoz de Hoyos, P. & G. Romero de Pérez.** 1991. Parasitismo en larvas de simúldos (Diptera: Simuliidae) del río Teusacá: Microsporidios, Mermítidos y Hongos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact* 18(69): 253-264.

Vavra, J. & A.H. Undeen. 1981. Microsporidia (Microspora: Microsporidia) from Newfounland blackfies (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 59(7): 1431-1446.

Wang. B. 1982. The pathobiology of the mosquito parasite *Vavraia culicis* (Weiser). Ph. D. Thesis. University of California. Los Angeles.

Weiser, J. 1982. Guide to fiel determination of major groups of pathogens affecting arthopod vectors of human diseases. WHO/VBC/82.860.

____ **& M. Coluzzi.** 1972. The microsporidian *Pleistophora culicis* Weiser (1946) in different mosquito hosts. *Folia Parasitol.* (Praha) 19: 197-202.

____ **& S. Prasertphon.** 1981. Four new Microsporidia found in the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Nigeria. *Folia Parasitologica* (Praha). 28: 291-301.